

UDC: 57.085:581.33:085.86:635.64

Оригинален научен труд
Original research paper

ВЛИЈАНИЕ НА ИНКУБАЦИСКИОТ ТРЕТМАН ВРЗ АНДРОГЕНЕЗАТА НА ПИПЕРКА (*Capsicum annuum* L.)

Колева-Гудева Лилјана

Краток извадок

Генетичарите и одгледувачите имаат голем број потешкотии во добивањето на хаплоидни растенија. Бројот на растителните видови кај кои хаплоиди спонтано се добиваат *in vivo* е само нешто повеќе од 100, но ова како правило во природата е сосема ретко. Кај пиперката (*Capsicum annuum* L.) единствен тип на експлантати, кои формираат соматски ембриониди се антери, незрели зиготски ембриониди и калус добиен од незрели зиготски ембриониди. Андрогенезата, која се одвива во услови *in vitro*, е најнов и најсигурен метод за добивање на хаплоидни единки, каде вегетативното или генеративното јадро од поленовото зрно се стимулира да се развие во хаплоидна индивидуа, без понатамошно оплодување.

Во овие истражувања испитувано е влијанието на различни инкубациски третмани во култура на антери *in vitro*, од повеќе различни сорти на пиперка.

Клучни зборови: *in vitro*, инкубациски третмани, антери, пиперка (*Capsicum annuum* L.)

THE EFFECT OF INCUBATION TREATMEN ON THE PEPPER (*Capsicum annuum* L.) ANDROGENESIS

Koleva-Gudeva Liljana

Abstract

Genetics and breeders have a lot of troubles in obtaining of haploid plants. The number of plant species in which haploids *in vivo* spontaneous occurs is only bigger than 100, but this rule in the nature is very seldom. At

ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, Гоце Делчев б.б.,
2 400 Струмица, Македонија
Institute of Southern Crops-Strumica, Goce Delcev b.b., 2 400 Strumica, Macedonia

the pepper the only type of explants, which formed somatic embryos are anthers, immature zygotic embryos and the callus formed from immature zygotic embryos. Androgenesis is new and assured method for creation of haploid plants, where the vegetative or generative nucleus from the pollen grain has been stimulated for developing in the haploid individual, without further fertilization.

The purpose of this examination was to test the different incubation treatments in the anther culture *in vitro* of different pepper varieties.

Key words: *in vitro*, incubation treatments, anthers, pepper (*Capsicum annuum* L.)

1. Вовед

Хаплоидните растенија се идеален материјал за испитувања од областа на генетиката и селекцијата на растенијата. Од друга страна, честотата на спонтаното добивање на хаплоиди по природен пат кај земјоделските култури е многу ниска од 10^{-6} до 10^{-3} . Затоа, една од поважните методи во областа на *in vitro* култивирање на растителните видови е и токму создавањето на голем број на хаплоидни и дихаплоидни единки за краток временски период. Овие хаплоиди/дихаплоиди би биле понатаму основа за генетички т.е. цитогенетски испитувања кои би ја оправдале целокупната постапка.

За индукција на соматската ембриогенеза во култура на антери, како и за зголемена продукција на хаплоиди, се користат различни стрес третмани или инкубациски третмани. Изборот на третманот кој би се употребил за секој нов генотип или вид може да се заснова само на консултираната обемна литература за култура на антери, во комбинација со сознанијата за регенерација на соодветниот генотип или вид (Collins и Edwards, 1998).

Цел на овие истражувања беше да се испита влијанието на три различни инкубациски методи, според George, 1973; Dolcet-Sanjuan, 1997 и според методот на Dumas de Valux, 1981, врз индукцијата на калус и формирањето на хаплоидни ембриони на девет различни сорти на пиперка.

2. Материјал и методи на работа

Како материјал за работа беа користени пупки од девет сорти на пиперка и тоа: слатко лута, лута везена, сиврија, феферона, златен медал, куртовска капија, калифорниско чудо, фехерозон и ротунд.

Стерилизацијата на пупките се одвиваше на следниот начин: најпрво пупките се промиваат во чешменска вода; потоа следи промивање во дестилирана вода; се промива 15 секунди во 70% C_2H_5OH (етанол); се промива 10 минути во 5% $Ca(ClO)_2$ со 2-3 капки Tween 20, и на крај пупките се промиваат неколкупати во стерилна вода.

Како индуccionи медиуми беа користени: MS (Murashige, T., и Skoog, F., 1962) медиум, LS (Linsmaer, E.M. и Skoog, F., 1965) медиум, N (Nitch, J.P., 1969) медиум, CP (Dumas de Valux, R., 1981) медиум и NN (Nitch, J.P. и Nitch, C., 1969) како двофазен медиум со носач. Носачите, во вид на буквата М, беа приготвени од стерилна филтер хартија и поставени во ерленмаерка на цврстата фаза а течната фаза го натопува носачот од каде антерата ги прима потребните хранливи елементи и хормони. Течната и цврстата фаза се изотонични раствори а разликата е само во агарот кој го нема во течната фаза.

Во индуccionи медиуми беа користени следните хормонални комбинации:

- MS + 1,0 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4 D + 0,001 mg/l IAA,
- N + 1,0 mg/l KIN + 0,001 mg/l IAA,
- LS + 3,0 mg/l KIN + 1,0 mg/l IAA,
- NN + 0,01 mg/l KIN + 0,001 mg/l 2,4D и
- CP + 0,01 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4D.

Во поставените култури од антери на пиперка беа испитувани три различни инкубациски третмани. Антерите се инкубирани:

- **7 дена на темно и на $+25\pm 2^\circ C$** , а потоа во клима комора на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло/12 h темно (George, 1973), на MS и N медиумите;

- **7 дена на темно и ладно на $+7\pm 2^\circ C$** , а потоа во клима комора на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло/12 h темно (Dolcet-Sanjuan, 1997) на NN и LS медиуми, и

- **8 дена на темно и топло на $+35\pm 2^\circ C$** , следните 4 дена во клима комора на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло/12 h темно, а потоа антерите се пренесуваат на P_1 медиум во клима комора на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло/12 h темно (Dumas de Valux, 1981) на CP медиум.

3. Резултати и дискусија

Со примена на инкубацискиот третман 7 дена на темно и на $+25\pm 2^\circ C$, а потоа во клима комора на $+25\pm 2^\circ C$, 12 h светло/12 h темно (George, 1973), антрите на MS и N медиумите исклучиво калусираа (Табела 1). Статистичката анализа (t-тест на зависни примероци) покажа дека процентот на калусирани антери е сигнификантно

различен за сите испитувани сорти, и на двата медиуми. Единствено кај сортата сиврија нема статистички сигнификантна разлика во процентот на калусирани антери за N медиумот ($14,41 \pm 3,76\%$). И за двата испитувани медиуми се покажа дека лутите сорти имаат поголема способност за индукција на калус за разлика од слатките и бабурестите сорти. Најмал процент на калусирани антери се јавува кај сортата фехерозон и на двата испитувани медиуми (MS $4,94 \pm 0,39^{**}\%$; NN $4,85 \pm 1,66^{**}\%$).

Влијанието на индукционата температура, темно и ладно на $+7 \pm 2^\circ\text{C}$ а потоа во клима комора на $+25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h светло/12 h темно (Dolcet-Sanjuan, 1997) на LS и NN медиумите, врз андрогенезата на пиперка, прикажано е во табела 2. На LS медиумот не се јавува забележителна разлика во индукцијата на калус од антерите на испитуваните сорти на пиперка. Лутите сорти и овде имаат највисок процент на калусирани антери а слатките сорти на LS со инкубација на ладно и темно го зголемуваат процентот на калусирање, за разлика од MS и N кога се инкубираат на топло и темно.

На двофазниот NN медиум сите испитувани сорти индуцираат калус, со тоа што, за разлика од другите испитувани третмани, овде процентот на калусирање кај лутите сорти се намалува а кај слатките се зголемува. Калусирањето е поумерено а со нависок процент калусирале антерите на сортата феферона $19,36 \pm 0,70^{**}\%$, а со најнизок на сортата везена лута $5,03 \pm 0,50^{**}\%$.

Единствено со користење на индукцискиот третман по методот на Dumas de Valux, 1981 на CP медиум, добиено е индукција на хаплоидни ембриониди а калусирањето за разлика од претходните два индукциски третмани е минимално (Табела 3). Овој инкубациски третман трае вкупно 12 дена и тоа, првите 8 дена антерите се инкубираат на на CP медиум, на темно и топло на $+35 \pm 2^\circ\text{C}$, следните 4 дена во клима комора на $+25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h светло/12 h темно. Потоа антерите се пренесуваат на R₁ медиум во клима комора на $+25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h светло/12 h темно. Од сите девет испитувани сорти, пет покажаа способност за формирање на ембриониди и тоа: слатко лута - со слаб андрогенетски потенцијал; златен медал - со слаб андрогенетски потенцијал; куртовска капија - со слаб андрогенетски потенцијал; калифорниско чудо - со просечен потенцијал, и фехерозон - со одличен андрогенетски потенцијал (слика 1 а и б).

Андрогенетскиот потенцијал е одредуван според процентот на ембриогенетски антери, по класификацијата на Mityko, J. и сор., 1995.

4. Заклучок

Механизмот на топлиот и ладниот температурен шок во индукцијата на андрогенезата е истражуван и дискутиран од голем број на автори (Dolcet-Sanjuan, 1997; Dumas de Valux, 1981; Matsubara, 1992; Munyon, 1989), но до денес, во потполност уште не е разјаснет. Врз база на литературни податоци, топлиот стрес (+35°C) има поголем ефект од ладниот (+7°C) во стимулирањето на делбената активност за микроспорите, што се потврди и со резултатите од овие истражувања. Температурните стрес инкубациски третмани имаат влијание на поттикнувањето на андрогенетските процеси. Ладниот, на LS и NN медиум, и топлиот стрес третман, на CP медиум, значително го намалија калусирањето на антерите, во споредба на MS и N медиумот, каде антерите се инкубираа на + 25°C. Единствено на CP медиумот добиени се хаплоидни ембриониди од пет сорти на пиперка, а калусирањето е минимално.

Литература

Collin H. A. и Edwards S. (1998): Plant Cell Culture, *BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK*.

Dolcet-Sanjuan R., Claveria, E., Huerta, A. (1997): Androgenesis in *Capsicum annuum* L. – Effects of Carbohydrate and Carbon Dioxide enrichment, *J. Amer. Soc. Sci.* 122(4):468-475.

Dumas de Valux, R., Chambonnet, D., Pochard, E. (1981): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35°C treatments. *Agronomie* 1(10): 859-864.

George L., and Narayanaswamy, S. (1973): Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis, *Protoplasma* 78, 467-470.

Matsubara, S., Hu, K. и Murakami, K. (1992): Embryoid and callus formation from pollen grains of eggplant and pepper by anther culture. *Journal of the Society of Horticultural Science* 61: 69-77.

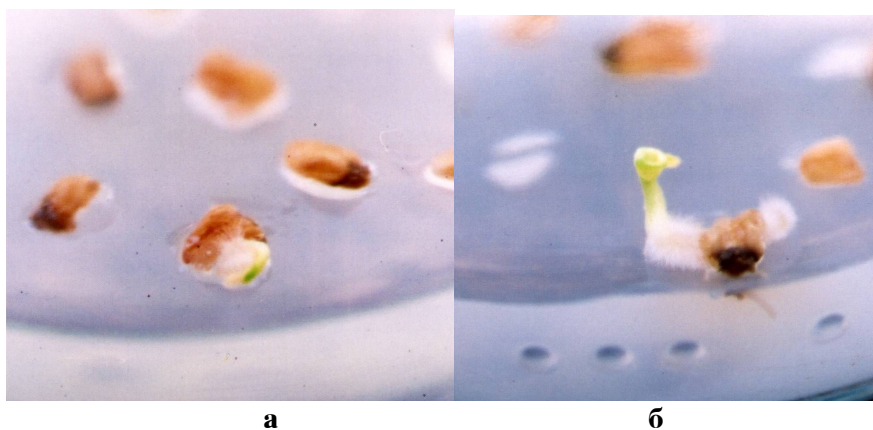
Mityko, J. (1996): Anthere Culture in pepper (*Capsicum annuum* L.), Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary, *Labaratory manual* 1-8.

Mityko, J., Andrasfalvy, G., Csillery, G., Fary. M. (1995): Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Breeding* 114, 78-80.

Munyon, I.P., Hubstenberg, J.F. и Phillips, G.C.: (1989): Oring of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 25:293-296.

Murashige, T., и Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, Vol. 15: 473-497.

Pierik R.L.M. (1998): *In vitro* Culture of Higher Plants, Department of Horticulture, Wageningen Agricultural University, The Netherland.



Слика 1. а. Појава на хаплоиден ембрион на CP медиум

б. Развој на хаплоиден изданок на R₁ медиум

Figure 1. a. Appearance of haploid embryo on CP medium

b. Development of haploid shoot on R₁ medium

Табела 1. Влијание на инкубацискиот третман темно и $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ на MS и N медиумите врз андрогенезата на пиперка *Capsicum annuum* L.
Table 1. The effect of incubation treatment dark and $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ on MS and N mediums on the pepper *Capsicum annuum* L. androgenesis

сорт пиперка pepper varieties	МС медиум / МС медиум калусирани антери (%) callused anthers (%)	Н медиум / Н медиум калусирани антери (%) callused anthers (%)
феферона	36,49 \pm 2,29**	58,55 \pm 11,47***
слатко лута	48,90 \pm 4,91**	39,93 \pm 12,89**
везена лута	30,97 \pm 0,79**	9,84 \pm 4,51*
сиврија	11,42 \pm 1,28**	14,41 \pm 3,76
златен медал	14,90 \pm 1,82*	9,47 \pm 1,82*
куртовска капија	14,54 \pm 1,90*	8,03 \pm 2,84*
калифорниско чудо	21,09 \pm 5,80*	30,66 \pm 6,02***
ротунд	10,05 \pm 0,01**	9,26 \pm 0,85*
фехерозон	4,94 \pm 0,39**	4,85 \pm 1,66*

*Вредностите во секоја колона означени со *, **, *** се сигнификантно различни ($p < 0,05$, t-тест на зависни примероци); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; \pm S.D., $n = 3$.

* The values in each column marked with *, **, *** are significant different (t- test on dependent examples $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; \pm S.D., $n = 2$

Табела 2. Влијание на инкубацискиот третман темно и $+7\pm 2^{\circ}\text{C}$ на LS и NN медиумите врз андрогенезата на пиперка *Capsicum annuum* L.
Table 2. The effect of incubation treatment dark and $+7\pm 2^{\circ}\text{C}$ on LS and NN mediums on the pepper *Capsicum annuum* L. androgenesis

сорт пиперка pepper varieties	ЛС медиум калусирани антери (%) LS medium callused anthers (%)	НН двофазен медиум калусирани антери (%) NN two-phases medium callused anthers (%)
феферона	26,24 \pm 6,57	19,36 \pm 0,70**
слатко лута	34,30 \pm 2,07*	17,44 \pm 1,89*
везена лута	33,33 \pm 15,27	5,03 \pm 0,50**
сиврија	18,03 \pm 5,88	18,25 \pm 3,09*
златен медал	8,32 \pm 0,90*	11,40 \pm 0,82*
куртовска капија	15,22 \pm 1,34	9,32 \pm 0,89*
калифорниско чудо	13,67 \pm 1,56*	14,95 \pm 3,50
ротунд	17,37 \pm 2,47*	9,27 \pm 0,85*
фехерозон	13,42 \pm 7,49	11,63 \pm 2,86

*Вредностите во секоја колона означени со *, **, *** се сигнификантно различни ($p < 0,05$, t-тест на зависни примероци); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; \pm S.D., $n = 3$.

* The values in each column (group) marked with *, **, *** are significant different (t- test on dependent examples $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; \pm S.D., $n = 2$

Табела 3. Влијание на инкубациониот третман темно и $+35\pm 2^{\circ}\text{C}$ на CP медиумот врз андрогенезата на пиперка *Capsicum annuum* L.
 Table 3. The effect of incubation treatment dark and $+35\pm 2^{\circ}\text{C}$ on CP medium on the pepper *Capsicum annuum* L. androgenesis

сорт пиперка pepper varieties	CP medium / CP medium калусирани антери (%) callused anthers (%)	CP medium / CP medium ембриогенетски антери (%) embryogenetic anthers (%)
феферона	-	-
слатко лута	$6,83\pm 0,75^{***}$	$2,43\pm 0,20^{*}$
везена лута	$28,84\pm 7,85^{*}$	-
сиврија	$14,23\pm 1,85^{**}$	-
златен медал	$7,33\pm 1,29^{***}$	$3,31\pm 0,24^{*}$
куртовска капија	$8,25\pm 0,44^{***}$	$1,55\pm 0,50^{*}$
калифорниско чудо	$15,12\pm 5,00^{*}$	$6,16\pm 0,28^{*}$
ротунд	$19,00\pm 1,00^{***}$	-
фехерозон	$3,92\pm 1,38^{**}$	$33,66\pm 6,02^{**}$

*Вредностите во секоја колона означени со *, **, *** се сигнификантно различни ($p<0,05$, t-тест на зависни примероци); $p=0,05^{*}$, $p=0,01^{**}$, $p=0,001^{***}$; \pm S.D., $n=3$.

* The values in each column (group) marked with *, **, *** are significant different (t- test on dependent examples $p<0,05$); $p=0,05^{*}$, $p=0,01^{**}$, $p=0,001^{***}$; \pm S.D., $n=2$